

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 7 : A61K 38/18, A61P 9/10	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/35475
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juni 2000 (22.06.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP99/09864**

(22) Internationales Anmeldedatum: **13. Dezember 1999
(13.12.99)**

(30) Prioritätsdaten:
198 57 609.9 14. Dezember 1998 (14.12.98) DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: **EHRENREICH, Hannelore [DE/DE]; Valentinsbreite 21, D-37077 Göttingen (DE).
GLEITER, Christoph [DE/DE]; Am Unteren Herriesberg 5, D-72074 Tübingen (DE).**

(74) Anwalt: **PFENNING MEINIG & PARTNER GBR; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).**

(81) Bestimmungsstaaten: **AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: **METHOD FOR THE TREATMENT OF CEREBRAL ISCHAEMIA AND USE OF ERYTHROPOIETIN OR ERYTHROPOIETIN DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF CEREBRAL ISCHAEMIA**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG VON CEREBRALEN ISCHÄMIEN SOWIE VERWENDUNG VON ERYTHROPOIETIN ODER ERYTHROPOIETIN-DERIVATEN ZUR BEHANDLUNG VON CEREBRALEN ISCHÄMIEN**

(57) Abstract

The invention relates to a method for the treatment of cerebral ischaemia and to an agent for the treatment of cerebral ischaemia, notably in humans, of the kind seen, for example, in stroke patients. Surprisingly it was found that the peripheral administration of erythropoietin to ischaemic cerebral tissue has a marked protective effect. Erythropoietin dramatically reduces the area of permanently damaged cerebral tissue, notably in the penumbra, in comparison to results obtained with conventional measures without administration of erythropoietin.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Behandlung von cerebralen Ischämien sowie auf ein Mittel zur Behandlung cerebraler Ischämien insbesondere des Menschen, wie sie beispielsweise bei Schlaganfallpatienten auftreten. Überraschend wurde gefunden, daß die periphere Gabe von Erythropoietin auf das von der Ischämie betroffene cerebrale Gewebe einen ausgeprägt protektiven Effekt aufweist. Erythropoietin bewirkt dabei, daß der Bereich des dauerhaft geschädigten cerebralen Gewebes, insbesondere in der Penumbra, dramatisch verkleinert wird gegenüber herkömmlichen Maßnahmen bei cerebraler Ischämie ohne Erythropoetingabe.

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 7 : A61K 38/18, A61P 9/10	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/35475 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juni 2000 (22.06.00)
---	----	---

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/09864 (22) Internationales Anmeldedatum: 13. Dezember 1999 (13.12.99) (30) Prioritätsdaten: 198 57 609.9 14. Dezember 1998 (14.12.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: EHRENREICH, Hannelore [DE/DE]; Valentinsbreite 21, D-37077 Göttingen (DE). GLEITER, Christoph [DE/DE]; Am Unteren Herresberg 5, D-72074 Tübingen (DE). (74) Anwalt: PFENNING MEINIG & PARTNER GBR; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
--	---

(54) Titel: METHOD FOR THE TREATMENT OF CEREBRAL ISCHAEMIA AND USE OF ERYTHROPOIETIN OR ERYTHROPOIETIN DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF CEREBRAL ISCHAEMIA

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG VON CEREBRALEN ISCHÄMIEN SOWIE VERWENDUNG VON ERYTHROPOIETIN ODER ERYTHROPOIETIN-DERIVATEN ZUR BEHANDLUNG VON CEREBRALEN ISCHÄMIEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for the treatment of cerebral ischaemia and to an agent for the treatment of cerebral ischaemia, notably in humans, of the kind seen, for example, in stroke patients. Surprisingly it was found that the peripheral administration of erythropoietin to ischaemic cerebral tissue has a marked protective effect. Erythropoietin dramatically reduces the area of permanently damaged cerebral tissue, notably in the penumbra, in comparison to results obtained with conventional measures without administration of erythropoietin.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Behandlung von cerebralen Ischämien sowie auf ein Mittel zur Behandlung cerebraler Ischämien insbesondere des Menschen, wie sie beispielsweise bei Schlaganfallpatienten auftreten. Überraschend wurde gefunden, daß die periphere Gabe von Erythropoietin auf das von der Ischämie betroffene cerebrale Gewebe einen ausgeprägt protektiven Effekt aufweist. Erythropoietin bewirkt dabei, daß der Bereich des dauerhaft geschädigten cerebralen Gewebes, insbesondere in der Penumbra, dramatisch verkleinert wird gegenüber herkömmlichen Maßnahmen bei cerebraler Ischämie ohne Erythropoetingabe.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Geben	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mönchsmünster	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iland	MX	Mexiko	US	Verschiedene Staaten von Amerika
CA	Canada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Nameland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun			PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

Verfahren zur Behandlung von cerebralen Ischämien
sowie Verwendung von Erythropoietin oder
Erythropoietin-Derivaten zur Behandlung von
cerebralen Ischämien

5 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein
Verfahren zur Behandlung von cerebralen Ischämien
sowie auf ein Mittel zur Behandlung cerebraler
Ischämien von Säugetieren, insbesondere des Menschen,
wie sie beispielsweise bei Schlaganfallpatienten
auftreten.

10 Beim ischämischen Hirninfarkt unterscheidet man die
geschädigten Bereiche in ischämische Kernzone sowie
die den Kern umgebende sogenannte Penumbra. Das
Ausmaß von ischämischem Kern plus Penumbra
15 determiniert die Schadensgröße nach ischämischem
Insult.

Erythropoietin, auch abgekürzt als "EPO" bezeichnet, ist ein körpereigenes Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 30000 Dalton (W. Jelkmann, „Erythropoietin: Structure, Control of Production, and Function“, *Physiological Reviews*, 1992, Band 72, Seiten 449 bis 489). Es ist ein wesentlicher Wachstumsfaktor für die Produktion von Erythrozyten und wurde bereits 1977 erstmals isoliert.

Erythropoietin ist seit vielen Jahren in häufigem klinischem Gebrauch bei Patienten mit renaler Anämie bei Nephrodialyse, zur Gewinnung größerer Mengen autologen Blutes vor geplanten Operationen und geriet auch als Dopingmittel in die Schlagzeilen der Presse.

Dabei erwies sich Erythropoietin als ausgesprochen gut verträglich. Als relevante Nebenwirkungen sind insbesondere die oft therapeutisch erwünschte Stimulation der Hämatopoiese mit Polyglobulie sowie eine selten zu beobachtende arterielle Hypertonie zu nennen. Beide Auswirkungen sind hauptsächlich nach chronischer Erythropoietin-Gabe zu erwarten. Sie sind im Bedarfsfall relativ einfach durch medikamentöse Behandlung bzw. Aderlaß abzuheften. Unverträglichkeitsreaktionen bzw. anaphylaktische Reaktionen gehören bei Erythropoietin zu den Raritäten.

Bis heute gibt es keine wirksame Therapie cerebraler Ischämien, wie beispielsweise zur Behandlung von

Schlaganfallpatienten, ohne Eingriff in den Kopfbereich des Patienten.

5 Sakanaka M. et al. offenbaren in PNAS 1998, Band 95, nr. 8, S. 4635 - 4640, daß die zentrale Gabe von Erythropoietin im Tierversuch eine protektive Wirkung auf cerebrale Neuronen ausübt. Aufgrund der Kenntnis, daß die Blut-Hirn-Schranke durch größere Proteine nicht überwunden werden kann, erfolgt in sämtlichen Versuchen die Gabe des Erythropoietin direkt zentral 10 in den lateralen Ventrikel. Eine derartige unmittelbar intraventrikuläre Gabe des Erythropoietin, d.h. unmittelbare Infusion des Erythropoietin in das Hirngewebe scheidet jedoch beim Menschen aufgrund der hohen Risiken, die mit der Anlage und dem Unterhalt einer temporären 15 Ventrikeldrainage verbunden sind, beispielsweise Infektionen oder Blutungen, aus.

20 DelMastro L. et al. offenbaren in Oncologist 1998, 3/5, S. 314-318, daß die präventive Gabe von Erythropoietin eine Anämie in chemotherapeutisch behandelten Krebspatienten verhindern und damit präventiv das Risiko derartiger Patienten bzgl. einer 25 cerebralen Ischämie in Folge einer chemotherapeutisch verursachten Anämie reduzieren kann. Eine Therapie für eine bereits vorliegende cerebrale Ischämie, insbesondere bei nicht chemotherapeutisch behandelten Patienten, ist darin nicht offenbart.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Behandlung von cerebralen Ischämien, ein Mittel zur Verwendung bei der Behandlung cerebraler Ischämien sowie ein Mittel zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung cerebraler Ischämien zur Verfügung zu stellen, die einfach und möglichst nebenwirkungsfrei sowie risikenfrei angewandt werden können.

Diese Aufgabe wird durch das Verfahren nach Anspruch 1, die Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels nach Anspruch 9 sowie die Verwendung nach Anspruch 17 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen der erfindungsgemäßen Verfahren und Verwendungen werden in den jeweiligen abhängigen Ansprüchen gegeben.

Ansatzpunkt für das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäßen Verwendungen von Erythropoietin ist es, daß nach stattgefunder Ischämie, beispielsweise nach einem Schlaganfall, möglichst früh so viel wie möglich des geschädigten Hirngewebes, insbesondere der Penumbra, gerettet werden sollte. Es wurde gefunden, daß eine periphere Gabe von Erythropoietin einen ausgeprägt protektiven Effekt auf das von der Ischämie betroffene cerebrale Gewebe aufweist. Erythropoietin bewirkt dabei, daß der Bereich des geschädigten cerebralen Gewebes, insbesondere in der Penumbra, dramatisch verkeinert wird gegenüber herkömmlichen Maßnahmen bei cerebraler Ischämie ohne Erythropoietingabe.

5 Diese unerwartete gewebsrettende Wirkung des peripher gegebenen Erythropoietins bei cerebraler Ischämie des Menschen ist schon deshalb nicht selbstverständlich, da Erythropoietin bekanntermaßen als größeres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 30000 Dalton die Blut-Hirn-Schranke gewöhnlich nicht zu überwinden vermag. Eine unmittelbar intraventrikuläre Gabe des Erythropoietin, d.h. unmittelbare Infusion des Erythropoietin in das Hirngewebe scheidet jedoch beim Menschen gewöhnlich aus wegen Risiken, die mit der 10 Anlage und dem Unterhalt einer temporären Ventrikeldrainage verbunden sind, wie Infektionen oder Blutungen.

15 Es ist das Verdienst der vorliegenden Erfindung, zu erkennen und umzusetzen, daß überraschenderweise zur Behandlung einer stattgehabten cerebralen Ischämie unmittelbar nach dem schädigenden Ereignis Erythropoietin peripher als Arzneimittel gegeben werden kann und dann in das geschädigte Hirnareal 20 übergeht und wirksam wird.

25 Die periphere Gabe von Erythropoietin, d.h. diesseits der Blut-Hirn-Schranke, erfolgt vorteilhafterweise intramuskulär oder vaskulär. Eine unmittelbar vaskuläre Gabe, die bekanntermaßen vorteilhafterweise bei Arzneimitteln meist intravenös erfolgen sollte, bietet sich hier geradezu an, um das Erythropoietin innerhalb eines kurzen Zeitraums, d.h. so rasch wie möglich nach dem schädigenden Ereignis, in einer

hohen Dosis zu dem geschädigten cerebralen Gewebe zu bringen.

Es ist daher davon auszugehen, daß Erythropoietin unmittelbar nach der Schädigung des Hirngewebes durch die Ischämie in den geschädigten Bereichen die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Daher ist es möglich, dem beispielsweise durch einen Schlaganfall geschädigten Patienten ein Arzneimittel, das Erythropoietin enthält, zu verabreichen, wobei das Erythropoietin tatsächlich das geschädigte Hirngewebe erreicht.

Damit steht erstmals ein wirksames Therapeutikum für die cerebrale Ischämie bei Säugetieren, insbesondere beim Menschen, wie beispielsweise bei einem Schlaganfall, zur Verfügung.

Vorteilhaft ist dabei weiterhin, daß die intakte Blut-Hirn-Schranke in den nicht-geschädigten cerebralen Gewebebereichen ein Eindringen des dort nicht benötigten Erythropoietin weiterhin wirksam verhindert und so die nicht von dem ischämischen Infarkt betroffenen Gewebebereiche von der Therapie nicht beeinflußt werden, also auch keine oder nur stark verringerte Nebenwirkungen auftreten können.

Vorteilhafterweise wird Erythropoietin als Arzneimittel mit einer Dosierung in Höhe von 5000 bis 100000 Einheiten, idealerweise von 35000 Einheiten, pro Gabe, möglichst mit einer Gabe pro Tag in den

ersten Tagen, erstmals möglichst innerhalb von 8
Stunden nach dem Schlaganfall, angewandt. Es genügen
dabei einige wenige Gaben von Erythropoietin, um den
therapeutischen Effekt herbeizuführen. Dies hat
5 weiterhin den Vorteil, daß die hauptsächlich bei
langdauernden, kontinuierlichen Behandlungen anderer
Krankheitsbilder nach dem oben beschriebenen Stand
der Technik beobachteten Nebenwirkungen und Risiken
bei der Verwendung von Erythropoietin zur Behandlung
10 cerebraler Ischämie nicht oder nur geringfügig
auftreten werden.

Erythropoietin ist aus dem Stand der Technik bekannt.
Humanes Erythropoietin wurde erstmals aus Urin
isoliert (T. Miyake et al. 1977, J. Biol. Chem., Bd.
15 252, S. 5558 - 5564). Heute erfolgt die Herstellung
durch DNA-Rekombination. Durch diese Methode kann es
in ausreichenden Mengen hergestellt und
erfindungsgemäß verwendet werden. Auch weitere
Varianten des Erythropoietins mit veränderter
20 Aminosäuresequenz oder -struktur oder auch
Bruchstücke mit den für die biologische Funktion des
Erythropoietin relevanten funktionellen
Sequenzabschnitten können für die erfindungsgemäße
Verwendung eingesetzt werden und sollen unter den
25 Begriff "Erythropoietin", wie er in dieser Anmeldung
verwendet wird, fallen. Variabilität der
erfindungsgemäß einsetzbaren Erythropoietin-Varianten
ergibt sich weiterhin aus Abwandlungen in der
Glycosilierung des Erythropoietins.

Bei dem erfindungsgemäß zu verwendenden Erythropoietin kann es sich folglich unter anderem um das humane Erythropoietin handeln, wie es natürlicherweise vorkommt, oder auch um 5 Erythropoietin-Produkte bzw. Erythropoietin-Analoga (allgemein: Erythropoietin-Varianten bzw. -Derivate), die Abwandlungen von dem natürlichen humanen Erythropoietin aufweisen, wie zum Beispiel 10 Modifikationen der Sequenz wie Deletionen und Substitutionen, oder auch Abwandlungen der Kohlenhydratzusammensetzungen. Derartige Erythropoietin-Produkte können durch verschiedene 15 Herstellungsverfahren erzeugt werden. Derartige Herstellungsverfahren für erfindungsgemäß einsetzbare Erythropoietin-Varianten, -Derivate bzw. -Analoga sind beispielsweise in den Patentanmeldungen WO 86/03520, WO 85/02610, WO 90/11354, WO 91/06667, WO 91/09955, WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560 und WO 95/05465 beschrieben, deren Offenbarungen sämtlich 20 vollständig hiermit in den Offenbarungsgehalt in die vorliegende Patentanmeldung per Referenz hierauf aufgenommen und in die vorliegende Patentanmeldung eingeschlossen sein sollen.

25 Im folgenden werden Beispiele für das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäßen Verwendungen gegeben.

Es zeigen:

Fig 1 das Auftreten von Erythropoietin im Serum und in der Cerebrospinalflüssigkeit nach einem Schlaganfall, sowie

Fig. 2 das Läsionsausmaß nach cerebraler Ischämie.

5 In Fig. 1A ist der Mittelwert der Serumkonzentration von 4 Patienten mit Schlaganfall, d.h. deren periphere Konzentration von Erythropoietin über mehrere Tage aufgetragen, denen ca. 8 Stunden, ca. 24 Stunden und nochmals ca. 48 Stunden nach dem Schlaganfall jeweils eine Dosis von 35000 IE humanes 10 rekombinantes Erythropoietin (Präparat "Neorecormon" der Fa. Hoffmann-LaRoche AG) intravenös gegeben wurde. Es ist zu erkennen, daß die Serumkonzentration innerhalb der ersten Tage ihr Maximum erreicht und anschließend wieder stark abfällt.

15 In Fig. 1B sind die Konzentrationen von EPO in sechs Kontrollpatienten mit nichtischämischen neurologischen Erkrankungen ("Neurological Disease Controls") nach Infusion von Erythropoietin, in zwei 20 unbehandelten Schlaganfallpatienten ("Stroke Controls") ohne Infusion von Erythropoietin sowie in vier Schlaganfallpatienten ("EPO-Patients") nach Infusion von Erythropoietin wie bei den Kontrollpatienten dargestellt. Dargestellt ist dabei 25 der Mittelwert der EPO-Konzentration in der Cerebrospinalflüssigkeit, wie er im Mittel 6,4 Stunden nach einer ersten Infusion von 35000 IE humanen rekombinanten Erythropoietins (Präparat "Neorecormon" der Fa. Hoffmann-LaRoche AG) bestimmt

wurde. Bei den vier Schlaganfallpatienten ("EPO-Patients") handelt es sich um dieselben Patienten wie in Fig. 1A.

Es ist, unter Berücksichtigung der verwendeten
5 logarithmischen Skala der Darstellung in Fig. 1B,
unmittelbar zu erkennen, daß die Konzentration des
Erythropoietin in der Cerebrospinalflüssigkeit in
Schlaganfallpatienten ("EPO-Patients") um das ca.
100-fache über der der gleich behandelten
10 Kontrollpatienten ("Neurological Disease Controls")
oder auch der unbehandelten Schlaganfallpatienten
("Stroke-Controls") liegt.

Es ist das Verdienst der vorliegenden Erfindung, zu
erkennen, daß im Falle einer cerebralen Ischämie die
15 Blut-Hirn-Schranke für Erythropoietin durchlässig
wird, so daß zur Behandlung einer cerebralen Ischämie
unmittelbar nach dem schädigenden Ereignis
Erythropoietin peripher als Arzneimittel in das
geschädigte Hirnareal übergehen und wirksam werden
20 kann.

Fig. 2 zeigt das Läsionsausmaß nach einem
Schlaganfall bei einem 73 Jahre alten Patienten. Die
gezeigten Aufnahmen wurden mittels magnetischer
25 Kernresonanzspektroskopie ("diffusion-weighted MRI")
erzeugt.

Der Patient wurde ca. 8 Stunden nach einem
Schlaganfall mit 35000 IE humanem rekombinantem
Erythropoietin (Präparat "Neorecormon" der Fa.
Hoffmann-LaRoche AG) intravenös infundiert. Ca. 24
30 Stunden und 48 Stunden nach dem Schlaganfall wurde

jeweils eine weitere gleich hohe Dosis Erythropoietin gegeben.

5 Fig 2A zeigt dabei drei Schnittansichten von unten während des Therapieverlaufs durch das Gehirn des Patienten ca. 7 Stunden nach dem Schlaganfall.

Deutlich durch ihre weiße Färbung abgesetzt sind die durch den Schlaganfall geschädigten Bereiche zu erkennen.

10 In Fig. 2B sind die geschädigten Bereiche ca. 3 Tage nach dem Schlaganfall ebenfalls durch ihre weiße Färbung (mit dunklem Kern) zu erkennen..

15 Fig. 2C zeigt dieselben Schnittansichten nach 18 Tagen. Deutlich zu erkennen ist, daß es zu einer markanten Reduktion der Primärläsion kam. Diese Reduktion des ischämischen Infarktareals ist u.a. der Behandlung mit Erythropoietin zuzuschreiben.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Behandlung von cerebralen Ischämien eines Säugetieres, dadurch gekennzeichnet, daß Erythropoietin peripher appliziert wird.
5
2. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Applikation vaskulär erfolgt.
3. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Applikation intravenös erfolgt.
10
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Erythropoietin zur Behandlung des Schlaganfalls appliziert wird.
15
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Erythropoietin in einer Dosis von 5000 IE bis 20 100000 IE pro Gabe und/oder pro Tag appliziert wird.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Erythropoietin in einer Dosis von 35000 IE pro Gabe und/oder pro Tag appliziert wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Erythropoietin natives oder rekombinantes menschliches oder tierisches Erythropoietin oder ein Derivat hiervon appliziert wird.
5
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Säugetier ein Mensch behandelt wird.
9. Verwendung von Erythropoietin zur Herstellung eines peripher zu applizierenden Arzneimittels zur Behandlung von cerebralen Ischämien von Säugetieren.
10
10. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch zur Herstellung eines vaskulär zu applizierenden Arzneimittels.
15
11. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch zur Herstellung eines intravenös zu applizierenden Arzneimittels.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 11 zur Herstellung eines peripher zu applizierenden Arzneimittels zur Behandlung des Schlaganfalls.
20
13. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 12 in einer Dosis von 5000 IE bis 100000 IE pro Gabe und/oder pro Tag.

14. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 13 in einer Dosis von 35000 IE pro Gabe und/oder pro Tag.
- 5 15. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß als Erythropoietin ein natives oder rekombinantes menschliches oder tierisches Erythropoietin oder ein Derivat hiervon verwendet wird.
- 10 16. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Säugetier ein Mensch ist.
- 15 17. Verwendung von Erythropoietin als peripher zu applizierendes Mittel zur Behandlung von cerebralen Ischämien eines Säugetieres.
18. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch als vaskulär zu applizierendes Mittel.
19. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch als intravenös zu applizierendes Mittel.
- 20 20. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 19 zur Behandlung des Schlaganfalls.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 20 in einer Dosis von 5000 IE bis 100000 IE pro Gabe und/oder pro Tag.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 21 in einer Dosis von 35000 IE pro Gabe und/oder pro Tag.
- 5 23. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß als Erythropoietin ein natives oder rekombinantes menschliches oder tierisches Erythropoietin oder ein Derivat hiervon verwendet wird.
- 10 24. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Säugetier ein Mensch ist.

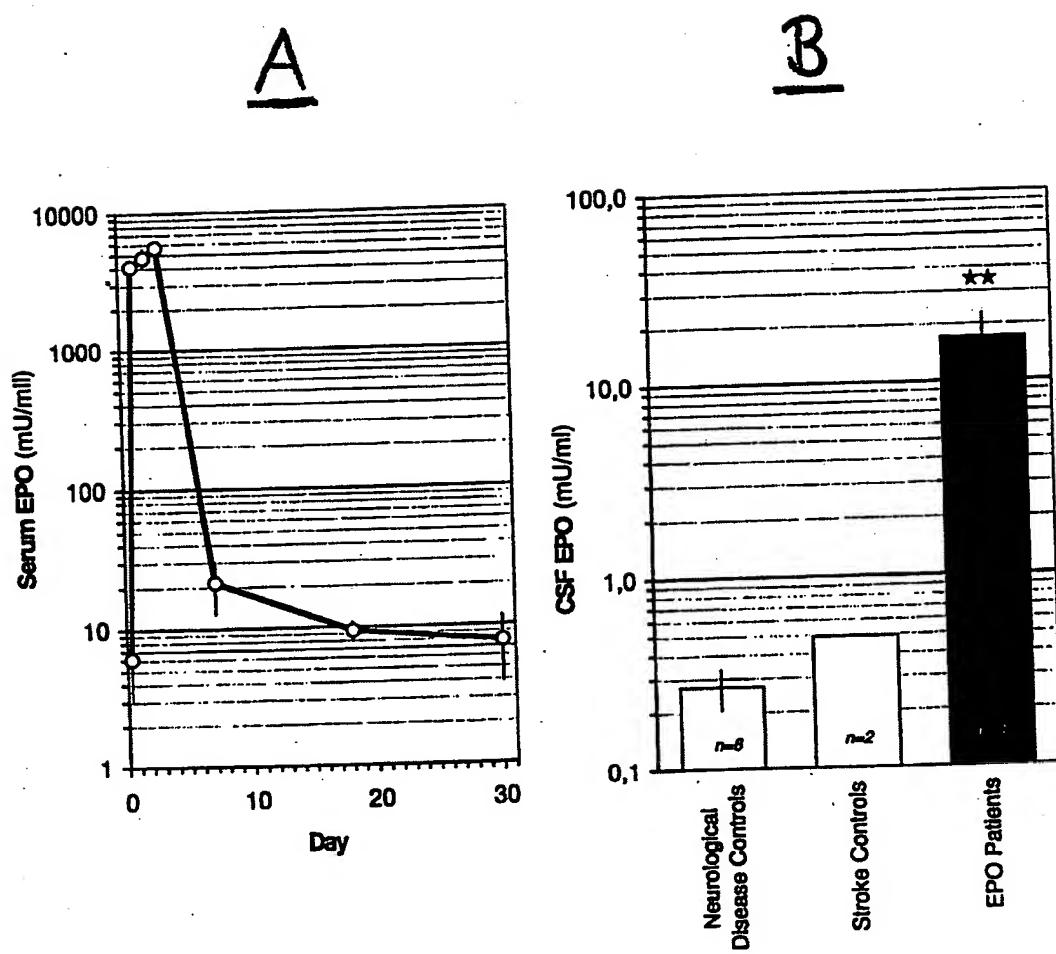


Fig. 1

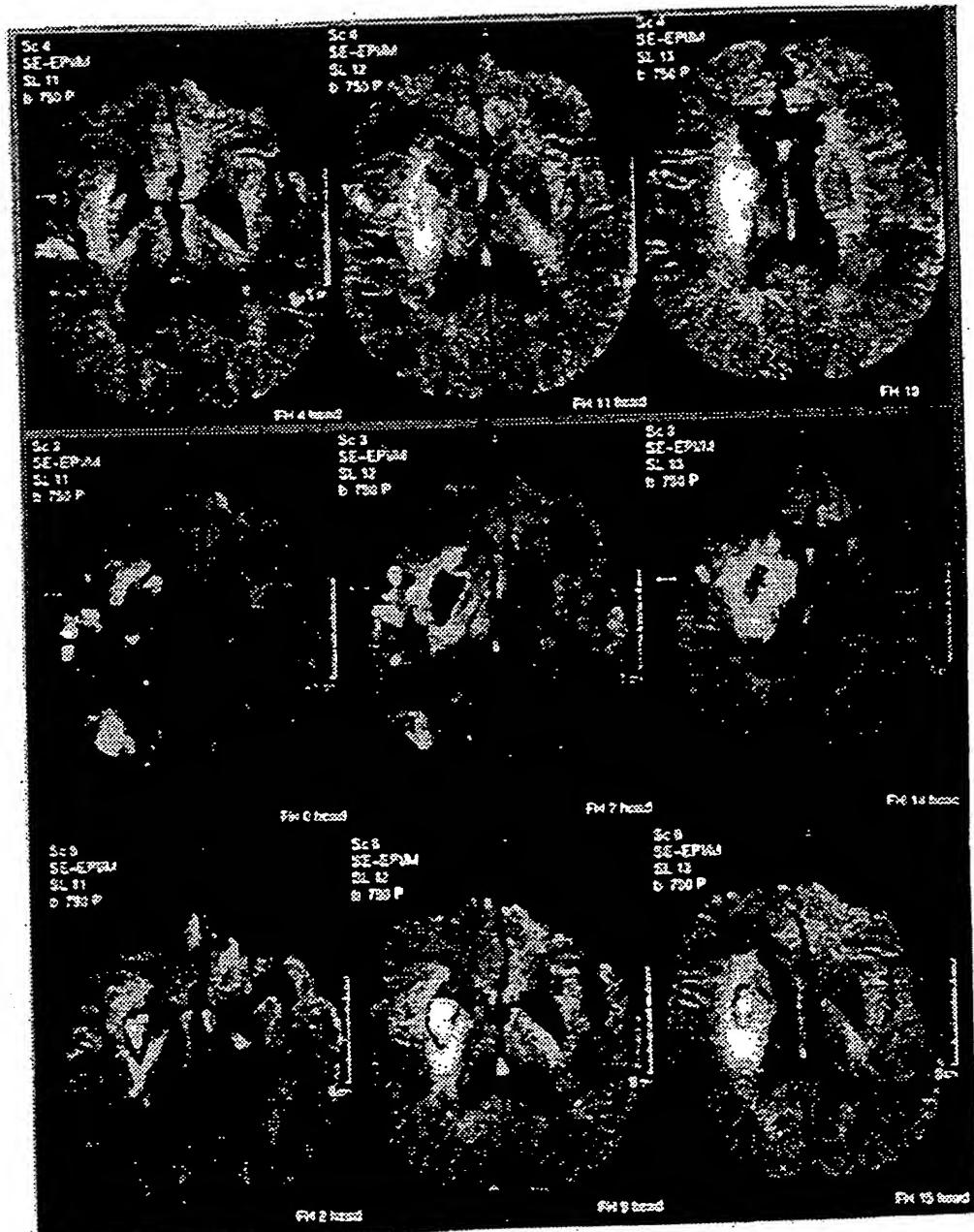


Fig. 2

2 / 2

BEST AVAILABLE COPY

CONTINENTAL TRANSLATION SERVICE, INC.

6 East 43rd Street • New York, NY 10017
Suite 2200 Telephone: (212) 867-3646
Fax No. (212) 867-3648

**Certified translation
from: German**

cts #

CERTIFICATE OF ACCURACY

STATE OF NEW YORK)
COUNTY OF NEW YORK)
S.S.:)

On this day personally appeared before me Leon Mindlin
who, after being duly sworn, deposes and says:

That he/she is a translator of the German and English languages by profession and as such is connected with CONTINENTAL TRANSLATION SERVICE, INC.

That he/she is thoroughly conversant with these languages.

That he/she has carefully made the attached translation from the original document written in the German language on the official paper of the CONTINENTAL TRANSLATION SERVICE, INC., and that the translation concerns patent no. PCT/EP99/09864 entitled "Method for the Treatment of Cerebral Ischemia and Use of Erythropoietin or Erythropoietin Derivatives for the Treatment of Cerebral Ischemia"

That the attached translation is a true and correct English version of such original, to the best of his or her knowledge and belief.

SUBSCRIBED AND SWORN TO BEFORE ME
THIS 3rd DAY OF November, 2000/

Antonella S.^o

ANTONELLA IZZO
Notary Public, State of New York
No. 0125034927
Qualified in Queens County
Certificate Filed in New York County
Commission Expires OCT. 24, 2002

PCT

WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY

[logo]

International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED ACCORDING TO THE CONVENTION ON
INTERNATIONAL COOPERATION IN THE FIELD OF PATENT MATTERS (PCT)

(51) International Patent Classification⁷

A61K 38/16 A61P 9/10 A2

(11) International Publication No.:

WO 00/35475

(43) International Publication Date:

June 22, 2000 (22.06.00)

(21) International File Classification: PCT/EP99/09864

(81) [Determining States] [see list of symbols]

(30) Priority Dates:

[illeg.] Dec. 14, 1998 (14.12.98) DE

(71) (72) Applicant and Inventor: EHRENREICH, Hannelore (DE/DE), Valerienbreite 21, D-3707, Göttingen (DE), GLEITER, Christoph (DE/DE), Am Unteren Herrenberg 3, D-72074, Tübingen (DE)

(74) Attorney: PRENNING, MEINIG & PARTNER, GBR. Mozartstrasse 13, D-80336 Munich (DE)

Published:

Devoid of International Research Report and (illegible) to be published again after the receipt of the Report.

(54) Title: [in English:] METHOD FOR THE TREATMENT OF CEREBRAL ISCHEMIA AND USE OF ERYTHROPOIETIN OR ERYTHROPOIETIN DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF CEREBRAL ISCHEMIA

(54) Designation: METHOD FOR THE TREATMENT OF CEREBRAL ISCHEMIAS AS WELL AS THE USE OF ERYTHROPOIETIN OR ERYTHROPOIETIN DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF CEREBRAL ISCHEMIAS

(57) Abstract: [abstract provided in English and German, the former cited below]

The Invention relates to a method for the treatment of cerebral ischemias and to an agent for the treatment of cerebral ischemias, notably in humans, of the kind such as, for example, in stroke patients. Surprisingly it was found that the peripheral administration of erythropoietin to ischemic cerebral tissues has a marked protective effect. Erythropoietin dramatically reduces the area of permanently damaged cerebral tissue, notably in the penumbra, in comparison to results obtained with conventional measures without administration of erythropoietin.

[Sheet with 2-letter abbreviations of PCT member states]

Methods for the treatment of cerebral ischemias as well as the use of erythropoietin or erythropoietin derivatives in the treatment of cerebral ischemias

The present Invention concerns a method for the treatment of cerebral ischemias of mammals, in particular of humans, such as those that appear in stroke patients.

In the case of ischemic cerebral infarct one distinguishes in the damaged region an ischemic core zone as well as the so-called penumbra which surrounds the core. The extent of the ischemic core plus penumbra determines the size of the damage after an ischemic insult.

Erythropoietin, which is also designated in abbreviated fashion as EPO, is an endogenous glycoprotein with a molecular weight of 30,000 dalton (W. Jelkmann, "Erythropoietin: Structure, Control of Production, and Function"), *Physiological Reviews*, 1992, vol. 72, pages 449-489). It is a significant growth factor for the production of erythrocytes and was first isolated as early as 1977.

For many years erythropoietin has frequently been used clinically on patients with renal anemia in the case of nephrodialysis, in order to obtain greater amounts of autologic blood before scheduled operations; it also made headlines as a doping agent.

In those cases erythropoietin proved to be markedly well tolerated. Among relevant side effects one should quote in particular the (often therapeutically desirable) stimulation of hematopoiesis with polycythemia, as well as a rarely seen arterial hypertension. Both these effects are to be expected primarily after chronic erythropoietin administration. If necessary, they can be handled in fairly simple fashion by medicinal treatment or phlebotomy.

Intolerance reactions or anaphylactic reactions are rare with erythropoietin.

In the past no effective therapies have been available for cerebral ischemias, such as for instance in the treatment of

stroke patients, without intervening into the patient's head region.

Sakanaka M. et al. disclosed in *PNAS* 1998, vol. 95, No. 8, pp. 4635-4640 that the central administration of erythropoietin in animal experiments produced a protective effect on cerebral neurons. Based on the knowledge that the blood-brain barrier could not be crossed by larger proteins, in all experiments the administration of erythropoietin was carried out in a directly central manner into the lateral ventricle. Such a direct intraventricular administration of erythropoietin — i.e., direct infusion of erythropoietin into the cerebral tissue — is however excluded in humans, because of the great risks connected with the introduction and maintenance of a temporary ventricle drainage, [such risks being] exemplified by infections or hemorrhages.

DelMastro L. et al. disclosed in *Oncologist*, 1998, 3/5, pp. 314-318, that the preventive administration of erythropoietin protects against anemia in chemotherapy-treated cancer patients, and thus can preventively reduce the risk undergone by such patients with respect to a cerebral ischemia as a consequence of a chemotherapeutically caused anemia. No therapy for an already existing cerebral ischemia — and in particular, none in chemotherapeutically treated patients — is disclosed there.

It is therefore the task of the present Invention to provide a method for the treatment of cerebral ischemias; an agent for use in the treatment of cerebral ischemias; as well as an agent for the preparation of a medicament for the treatment of cerebral ischemias, which can be applied as simply, as free of side effects, and as free of risks as possible.

This task is accomplished by the method according to Claim 1; the use for the preparation of a medicament according to Claim 9; as well as the use according to Claim 17.

Advantageous further developments of the methods and uses according to the Invention are provided in the respective dependent claims.

The starting point for the method according to the Invention and for the uses of erythropoietin according to the Invention is that, once an ischemia has occurred – e.g., after a stroke – one salvages at the earliest opportunity as much as possible of the damaged cerebral tissue, in particular the penumbra. It was found that a peripheral administration of erythropoietin displayed a clear-cut protective effect on the brain tissue struck by ischemia. In so doing, erythropoietin caused the region of damaged cerebral tissue, particularly in the penumbra, to be dramatically reduced, compared to traditional measures applied in cerebral ischemia, which measures did not include the administration of erythropoietin.

This unexpected tissue-salvaging effect of peripherally administered erythropoietin in cerebral ischemia of humans is not obvious, if nothing else because of the fact that erythropoietin, as a larger protein with a molecular weight of about 30,000 dalton, is normally unable to cross the blood-brain barrier. A direct intraventricular administration of erythropoietin — i.e., direct infusion of erythropoietin into the brain tissue — is normally excluded in humans, because of risks connected with the application and maintenance of a temporary ventricle drainage, such as infections or hemorrhages.

It is the merit of the present Invention to recognize and exploit the fact that, surprisingly, one can peripherally administer erythropoietin as a medicament to treat an existing cerebral ischemia, directly after the damaging event, and that it [erythropoietin] then passes into the damaged brain area and becomes effective.

The peripheral administration of erythropoietin — i.e., this side of the blood-brain barrier — is advantageously effected in an intramuscular or vascular manner. Direct vascular administration (which, as is known, is advantageously applied in medicaments by the intravenous avenue) is the obvious choice here to transport the erythropoietin within a short time span — i.e., as quickly as possible after

the damaging event – at a high dosage to the damaged cerebral tissue.

One can thus assume that erythropoietin can, immediately after the brain tissue was damaged by ischemia, cross the blood-brain barrier in the damaged regions. Consequently it is possible to administer, say to a patient damaged by a stroke, a medicament containing erythropoietin, whereby the erythropoietin actually reaches the damaged cerebral tissue.

This provides for the first time an effective therapeutic agent against cerebral ischemia in mammals, particularly humans, such as for instance in a stroke.

It is furthermore advantageous that the intact blood-brain barrier in the undamaged cerebral tissue regions continues to effectively prevent the penetration of the erythropoietin [into sites] where it is not needed, so that the tissue regions which were not struck by the ischemic infarct cannot be affected by the therapy, so that no or only very few side effects may appear.

Advantageously one uses erythropoietin as a medicament at a dosage of 5,000 to 100,000 units, ideally 35,000 units per administration, if at all possible with one administration per

day during the first few days, if at all possible starting within 8 hours after the stroke. In so doing a few administrations of erythropoietin are sufficient to produce the therapeutic effect. This brings the additional advantage that -- primarily in long-term continuous treatments of other symptoms according to the above-mentioned prior art -- the observed side effects and risks do not appear at all or only appear in small measure, when erythropoietin is used for the treatment of cerebral ischemia.

Erythropoietin is known in prior art. Human erythropoietin was first isolated from urine (T. Miyake et al., 1977, *J. Biol. Chem.*, vol. 252, pp. 5558 - 5564). Today its preparation is carried out through DNA recombination. By this method it can be produced in sufficient quantities and used according to the Invention. According to the Invention one can also use other variants of erythropoietin with different amino-acid sequences or structures, or else fragments with the functional sequence sections which are relevant for the biological function of erythropoietin; these are to be included in the concept of "erythropoietin" as used in this Application. Additional variability of the erythropoietin variants which can be used according to the Invention is the result of modifications in the glycosylation of erythropoietin.

Consequently, the erythropoietin to be used according to the Invention may cover, among others, human erythropoietin as naturally occurring, or else erythropoietin products or erythropoietin analogs (in general: erythropoietin variants or derivatives) which feature modifications of natural human erythropoietin, e.g. modifications of the sequence such as deletions and substitutions, or else modifications of the carbohydrate compositions. Such erythropoietin products may be created by different methods of preparation. For instance, such methods of preparation for erythropoietin variants, derivatives or analogs, useable according to the Invention, are described, say, in the Patent Applications WO 86/03520, WO 85/02610, WO 90/11354, WO 91/06667, WO 91/09955, WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 95/05465, whose disclosures are all fully incorporated by reference into the disclosure content of the present Patent Application and are included in the present Patent Application.

Below we are providing examples for the method according to the Invention and for the uses according to the Invention.

The following are shown:

Fig. 1, the appearance of erythropoietin in serum and in the cerebrospinal fluid, after a stroke, as well as

Fig. 2, the extent of the lesion, after cerebral ischemia.

In Fig. 1A, there is a plot of the mean values of serum concentration of 4 patients after a stroke – i.e., whose peripheral concentration of erythropoietin was plotted over several days, the patients having been administered intravenously, at about 8 hours, about 24 hours and again about 48 hours after the stroke, a dosage of 35,000 IU human recombinant erythropoietin (the preparation Neorecormon from the Hoffmann-LaRoche AG company). One can see that the serum concentrations reached their maximum within the first day and then dropped sharply again.

Fig. 1B shows that concentrations of EPO in six control patients with non-ischemic neurological diseases [in English:] (*Neurological Disease Controls*) after infusion of erythropoietin; in two untreated stroke patients [in English:] (*Stroke Controls*) without infusion of erythropoietin; as well as in four stroke patients [in English:] (*EPO Patients*), after infusion of erythropoietin as in the control patients. What is shown is a mean value of EPO concentration in the cerebrospinal fluid, as it was determined after an average of 6.4 hours after the first infusion of 35,000 IU of human recombinant erythropoietin (Neorecormon preparation from the Hoffmann-LaRoche AG company).

In the case of the four stroke patients (*EPO Patients*), these were the same patients as in Fig. 1A.

Keeping in mind that the scales used are logarithmic, the illustration in Fig. 1B clearly shows that the concentration of erythropoietin in the cerebrospinal fluid in stroke patients (*EPO Patients*) lies at a level about 100 times higher than that of the equally treated control patients (*Neurological Disease Controls*), as well as the untreated stroke patients (*Stroke Controls*).

It is the merit of the present Invention to recognize that in the case of a cerebral ischemia the blood-brain barrier becomes transposable by erythropoietin, so that, in order to treat a cerebral ischemia immediately after the damaging event, erythropoietin peripherally [administered] as a medicament can pass into the damaged brain area and become effective.

Fig. 2 shows the lesion extent after a stroke in a 73-year old patient. The records shown were produced by means of magnetic nuclear resonance spectroscopy [in English:] (*Diffusion-Weighted MRI*).

The patient was intravenously infused, about 8 hours after a stroke, with 35,000 IU of human recombinant erythropoietin (Neorecommon preparation from the Hoffmann-LaRoche AG company). About 24 hours and 48 hours after the stroke, a

further, equally high dosage of erythropoietin was administered.

Fig. 2A shows three cross-sectional views from below, during the therapy process, through the brain of the patient, about 7 hours after the stroke. The regions damaged by the stroke can be clearly recognized, distinguished by their white coloration.

In Fig. 2B, one can recognize the damaged regions, about 3 days after the stroke, again by their whitish coloration (with a dark core).

Fig. 2C shows the same cross-sectional views after 18 days. One can clearly see that there had occurred a significant reduction in the primary lesion. This reduction of the ischemic infarct area should be attributed, among others, to the treatment with erythropoietin.

Patent Claims

1. Method for the treatment of cerebral ischemias in mammals, characterized in that erythropoletin is applied peripherally.
2. Method according to the preceding Claim, characterized in that the application is carried out in vascular fashion.
3. Method according to the preceding Claim, characterized in that the application is carried out in intravenous fashion.
4. Method according to one of the preceding Claims, characterized in that the erythropoletin is applied for the treatment of a stroke.
5. Method according to one of the preceding Claims, characterized in that the erythropoletin is applied in a dosage of 5,000 IU to 100,000 IU per administration and/or per day.
6. Method according to one of the preceding Claims, characterized in that the erythropoletin is applied in a dosage of 35,000 IU per dosage and/or per day.

7. Method according to one of the preceding Claims, characterized in that one applies as erythropoletin native or recombinant human or animal erythropoletin or a derivative thereof.
8. Method according to one of the preceding Claims, characterized in that as a mammal one treats a human.
9. Use of erythropoietin for the preparation of a medicament to be peripherally applied in the treatment of cerebral ischemias of a mammal.
10. Use according to the preceding Claim, for the preparation of a medicament to be applied in vascular fashion.
11. Use according to the preceding Claim, for the preparation of a medicament to be applied in intravenous fashion.
12. Use according to one of the Claims 9 through 11, for the preparation of a medicament to be applied in peripheral fashion for the treatment of strokes.
13. Use according to one of the Claims 9 through 12, in a dosage of 5,000 IU to 100,000 IU per administration and/or per day.

14. Use according to one of the Claims 9 through 13, in a dosage of 35,000 IU per administration and/or per day.
15. Use according to one of the Claims 9 through 14, characterized in that one applies as erythropoietin native or recombinant human or animal erythropoietin or a derivative thereof.
16. Method according to one of the Claims 9 through 15, characterized in that the mammal is a human.
17. Use of erythropoietin for the preparation of an agent to be peripherally applied in the treatment of cerebral ischemias of a mammal.
18. Use according to the preceding Claim, for the preparation of an agent to be applied in vascular fashion.
19. Use according to the preceding Claim, for the preparation of an agent to be applied in intravenous fashion.
20. Use according to one of the Claims 17 through 19, for the treatment of strokes.
21. Use according to one of the Claims 17 through 20, in a dosage of 5,000 IU to 100,000 IU per administration and/or per day.

22. Use according to one of the Claims 17 through 21, in a dosage of 35,000 IU per administration and/or per day.
23. Use according to one of the Claims 17 through 22, characterized in that one applies as erythropoietin native or recombinant human or animal erythropoietin or a derivative thereof.
24. Method according to one of the Claims 17 through 23, characterized in that the mammal is a human.

[text is in English]

Fig. 1
REPLACEMENT SHEET (RULE, 26)

Fig. 2
REPLACEMENT SHEET (RULE, 26)